



УДК 577.112:612.822.1

ОБ УЧАСТИИ БЕЛКА S-100 В ФОСФОРИЛОВАНИИ БЕЛКОВ  
НУКЛЕОПЛАЗМЫ МОЗГА И ЕГО НАЛИЧИИ В  
РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ ЧАСТИЦАХ

КАПРАЛОВ А. А., ТЮЛЕНЕВ В. И., БЕЛИК Я. В.

Институт биохимии им. А. В. Павлова АН УССР, Киев

В опытах *in vitro* изучено влияние белка S-100 на фосфорилирование белков различных субъядерных фракций. Установлено, что исследуемый белок усиливает фосфорилирование фракции белков, которая экстрагируется из клеточных ядер раствором с 0,14 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис (рН 8,0) и содержит рибонуклеопротеидные частицы (РНП-частицы). В наибольшей степени увеличивается фосфорилирование белков с M<sub>r</sub> 80 и 150 кД. В присутствии белка S-100 уменьшается фосфорилирование ряда других белковых фракций. Методом иммунодиффузии белок S-100 обнаружен в составе РНП-частиц, выделенных из ядер мозга. Высказывается предположение, что белок S-100 может участвовать в процессах транспорта и процессинга гетерогенной ядерной РНК.

Ранее было показано, что белок S-100 при введении в желудочки мозга способен увеличивать в нем синтез РНК [1]. Добавление этого белка к изолированным клеточным ядрам вызывает увеличение активности РНК-полимеразы [2], что свидетельствует о том, что он может участвовать в синтезе и процессинге РНК в ядрах клеток мозга. В отличие от ранее полученных результатов [3], при использовании метода иммунодиффузии мы не смогли выявить наличие белка S-100 в составе хроматина клеток мозга [4]. В этих экспериментах белок S-100 был обнаружен лишь в составе нуклеоплазмы и ядерной мембраны. Показано также [5], что этот белок не оказывает влияния на фосфорилирование гистонов и щелочерастворимых легистоновых белков, в то время как фосфорилирование ряда других ядерных белков увеличивается в его присутствии. В связи с этим мы предположили, что белок S-100 непосредственно влияет на процессинг и транспорт РНК и лишь косвенно—на ее синтез. Исходя из этого, целью настоящей работы явилось изучение влияния белка S-100 на фосфорилирование белков ядерного сока, включение [<sup>32</sup>P] в нуклеиновые кислоты и исследование возможности локализации этого белка в РНП-частицах клеточных ядер мозга.

## Материалы и методы

В работе использовали мозг самцов белых крыс массой 150—200 г и серое вещество мозжечка быка. Белок S-100 получали по методу, описанному Stewart [6]. В опытах использовали фракцию IC, которую идентифицировали методами иммунопреципитации и электрофореза. Ядра мозга выделяли по методу, описанному в работе Burdman [7] с некоторыми нашими модификациями. Раствор сахарозы получали на ТКМ-6-ферре (50 мМ трис-HCl, pH 7,5; 25 мМ KCl; 5 мМ MgCl<sub>2</sub>). Для получения гомогената ткани использовали 20 объемов 0,32 М сахарозы на одну весовую часть ткани мозга. При центрифугировании концентрацию сахарозы доводили до 1,85—2,0 М. При работе с клеточными ядрами мозга ингибиторы протеаз не использовали, так как протеазной активности в ядрах мозга не было обнаружено [8]. Использование 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида в части опытов не вызывало каких-либо изменений в белковом составе полученных фракций. Ядерные мембраны выделяли в основном по методу, описанному в работе Aquiler, Gleed [9], однако обработку ДНКазой I («Koch-Light», Англия) проводили не в один, а в два этапа: вначале ядра подвергали протеолизу в течение ночи при концентрации фермента 1 мкг/мл и температуре 3°, а затем после 3-х последовательных отмывок с помощью NaHCO<sub>3</sub> в течение 20 мин при концентрации ДНКазы I 20 мкг/мл и температуре 22°. Характеристика полученных мембран ядер мозга описана в предыдущей работе [10]. В реакции фосфорилирования использовали клеточные ядра мозга крыс или фракции ядер мозжечка быка. Фосфорилирование исследовали по ранее описанному методу [5]. При изучении фосфорилирования инкубационная среда содержала 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мг белка клеточных ядер, 40 мкг белка S-100, 10 мкМ [<sup>32</sup>P] АТФ (2,2 · 10<sup>6</sup> имп/мин в пробе). Время инкубации—10 мин при температуре 37°. Реакцию останавливали добавлением 3 мл раствора, содержащего 0,5 мМ нерадиоактивной АТФ и 3,3 мл 10%-ной ТХУ с 3%-ным пирофосфатом натрия. Осадок промывали на фильтрах Synrog № 8 (ЧССР). Липиды экстрагировали, используя хлороформ-метанол [11]. Нуклеиновые кислоты удаляли обработкой осадка 5%-ной ТХУ при 90° в течение 30 мин. Для определения радиоактивности использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-1 и жидкостный сцинтилляционный счетчик SL-30 («Intertechnique», Франция). В некоторых опытах аликвоты полученных фракций использовали для электрофореза, который проводили по Laemmli [12]. В качестве разделяющего был использован 15%-ный ПААГ длиной 15—20 см. После фиксации, окраски Кумасси бриллиантовой голубым G-250 и отмывки гели денситометрировали с помощью микроденситометра «УТ-7609», затем их разрезали на диски шириной 1 мм, сушили в течение 3 ч при температуре 100° и определяли радиоактивность, используя сцинтилляционную жидкость ЖС-1.

При выделении РНП-частиц экстракцию ядер проводили по методу Самаринной и соавт. [13]. В ряде случаев РНП-частицы метили, вводя

крысам по 40 мкКи [ $^{14}\text{C}$ ] оротовой кислоты в желудочки-мозга за 1,5—2 ч до декапитации. Ядерный экстракт центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 10—25% в течение 3,5 ч при 27000 об/мин на центрифуге К-32 М. Плавучую плотность частиц определяли с помощью центрифугирования в градиенте  $\text{CsCl}$  [13, 14]. В этом случае фракции, полученные из градиента сахарозы, анализировали против 1%-ного формальдегида в 0,005 М фосфатном буфере (рН 7,5), смешивали с концентрированным  $\text{CsCl}$  в 1%-ном формальдегиде, доводя плотность смеси до 1,3 г/см<sup>3</sup>, и использовали для создания непрерывного преобразованного градиента  $\text{CsCl}$ . В другое колено смесителя помещали раствор  $\text{CsCl}$  в 1%-ном формальдегиде с плотностью 1,6 г/см<sup>3</sup>. Центрифугировали в роторе «SW-39» в течение 18 ч при скорости 150000 г и температуре 4°. Собирали фракции и определяли в них кислотонерастворимую радиоактивность и показатель преломления. Реакцию иммунодиффузии проводили по методу Гусева, Цветкова [15]. В исследованиях использовали специфическую кроличью антисыворотку, полученную к белку S-100 из мозга быка [4].

### Результаты и обсуждение

При изучении зависимости процесса включения [ $^{32}\text{P}$ ] в клеточные ядра от содержания добавленного белка S-100 показано, что небольшие его количества (30 мкг/мл) и количества, превышающие физиологическую концентрацию (300 мкг/мл), практически не влияют на этот процесс, а при концентрации белка 60—120 мкг/мл наблюдается увеличение включения метки на 30% (рис. 1). Однако при удалении нуклеиновых кислот из инкубированных ядер обнаружено, что низкие концентрации белка S-100 вызывают увеличение на 50%, а высокие—уменьшение на 20% включения метки в неэкстрагированный остаток ядра, что свидетельствует о связи этого белка с обменом РНК.

Предполагая, что действие белка S-100 может быть опосредовано фосфорилированием белков лишь определенных фракций ядра, изучали влияние этого белка на фосфорилирование эндогенными протеникиназами белков хроматина, ядерных мембран клеток мозжечка быка, а также фракций, экстрагируемых из ядер клеток этой ткани раствором, содержащим 0,14 М  $\text{NaCl}$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ трис- $\text{HCl}$  при рН 7,0 и 8,0 (таблица). В этих опытах было обнаружено включение [ $^{32}\text{P}$ ] во все изученные фракции, что согласуется с данными литературы о присутствии эндогенных протеникиназ в составе ядерных мембран [16], нуклеолазмы [17], РНП-частиц [18, 19] и хроматина [20]. Обнаружено (таблица), что фосфорилирование белков, экстрагируемых из ядер раствором, содержащим 0,14 М  $\text{NaCl}$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ трис- $\text{HCl}$ , рН 7,0 (фракция рН 7,0), а также белков хроматина не изменяется при добавлении в среду инкубации белка S-100. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты [5], свидетельствующие о том, что белок S-100 не влияет на фосфорилирование гистонов и негистоновых белков, экстрагируемых

щелочью. Однако в наших условиях (таблица) наблюдается увеличение фосфорилирования белков фракции, экстрагируемой из ядер раствором, содержащим 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM трис-HCl, pH 8,0 (фракция pH 8,0), и белков фракции ядерных мембран на 60 и 70% соответственно.

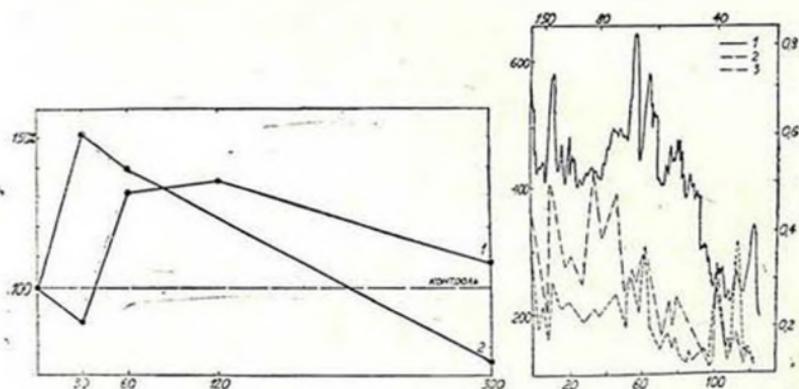


Рис. 1. Влияние белка S-100 на включение [<sup>32</sup>P] (в %) изолированными клеточными ядрами мозга крысы: 1—суммарное включение [<sup>32</sup>P], 2—включение [<sup>32</sup>P] после экстракции нуклеиновых кислот. По оси абсцисс—концентрация белка S-100 (мкг/мл)

Рис. 2. Влияние белка S-100 на фосфорилирование белков, экстрагируемых из ядер 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM трис, pH 8,0: 1—денситограмма электрофореза белков фракции pH 8,0, 2—фосфорилирование белков фракции pH 8,0 без белка S-100, 3—фосфорилирование белка фракции pH 8,0 в присутствии белка S-100. По оси абсцисс сверху—величина M<sub>r</sub> 10<sup>3</sup> Д, снизу—длина геля в мм. По оси ординат слева—включение [<sup>32</sup>P] АТР (имп/мин), справа—A<sub>250</sub>

Для выяснения вопроса о том, какие именно белки фосфорилируются в присутствии белка S-100, нами был проведен электрофорез белков фракции pH 8,0 и фракции ядерных мембран (рис. 2). Денситограмма электрофореза белков фракции pH 8,0 из мозга быка в общем совпадает с денситограммами электрофореза подобных фракций мозга крысы [21, 22]. Некоторые несоответствия, видимо, можно объяснить отличиями исходного материала и методов выделения РНП-частиц. Из рис. 2 видно, что больше всего метки включается в две белковые фракции с M<sub>r</sub> около 40 кД и в две фракции с M<sub>r</sub> около 70 кД. При изучении фосфорилирования подобной фракции мозга крысы *in vivo* [22] также было обнаружено повышенное включение меченого фосфора в эти белковые фракции. Однако наряду с этим происходит значительное фосфорилирование белков с M<sub>r</sub> более 80 кД. В опытах этих авторов [22] также было показано, что фосфопротенды, входящие в состав двух фракций с M<sub>r</sub> около 40 кД, являются белками РНП-частиц.

Из данных, приведенных на рис. 2, можно сделать вывод, что при добавлении белка S-100 увеличивается включение метки в белки с  $M_r$  70—150 кД и ~50 кД. Наибольшее включение метки происходит во фракциях с  $M_r$  около 150 кД (фракции 14—17) и около 80 кД (фракции 30—50). Нами показано, что в этих условиях уменьшается фосфорилирование одного из белков с  $M_r$  40 кД (рис. 2), который, по данным литературы [21], может входить в состав РНП-частиц. В состав РНП-

Таблица

Влияние белка S-100 на фосфорилирование белков во фракциях, экстрагируемых из ядер мозжечка быка (имп/мин/1 мг белка)

Ядерные фракции	Без белка S-100	В присутствии белка S-100	% к контролю	n	p
Экстрагируемая при pH 7.0	2471±168	2715±240	110	10	>0.5
Экстрагируемая при pH 8.0	3960±1595	6050±878	160	12	<0.05
Мембраны	3020±343	5057±375	170	7	<0.05
Хроматин	3288±358	3511±237	110	12	>0.5

частиц могут входить и некоторые из белков с  $M_r$  80—150 кД [21, 22]. Предположение о влиянии белка S-100 на фосфорилирование белков РНП-частиц подтверждается тем, что этот белок не изменяет суммарного фосфорилирования белков фракции pH 7.0, в которой эти частицы отсутствуют (она содержит в основном белки нуклеоплазмы и ядерных рибосом) [13]. Из рис. 2 видно, что существуют фракции белков, фосфорилирование которых уменьшается в присутствии белка S-100. Вероятно, это можно объяснить влиянием белка S-100 на фосфопротеин-фосфатазу, присутствие которой в препарате РНП-частиц показано в работе Wilks, Knowler [19]. Интересно отметить, что другой  $Ca^{2+}$ -связывающий белок—кальмодулин не влияет на фосфорилирование белков в РНП-частицах, а  $Ca^{2+}$  незначительно его ингибирует [23]. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что белок S-100 может участвовать в регуляции фосфорилирования белков нуклеоплазмы и ядерных мембран.

Так как среди белков, фосфорилирование которых увеличивается в присутствии белка S-100, могут быть белки РНП-частиц, мы изучили возможность локализации белка S-100 в составе этой ядерной структуры. РНП-частицы, полученные нами из серого вещества мозжечка быка и мозга крысы, были довольно гетерогенны по размеру (рис. 3, 4), что соответствует данным, полученным при изучении РНП-частиц из мозга крысы [24]. Аналогичные результаты получены при выделении РНП-частиц из ткани печени с использованием ингибитора РНКаз [13].

Для устранения возможного загрязнения частиц агрегированными белками ядерного сока в опытах по иммунодиффузии в качестве РНП-частиц использовали фракции с коэффициентом седиментации более 80S. Плавающая плотность исследованных препаратов частиц при центрифуги-

ровании в CsCl составляла 1,40 г/см<sup>3</sup>. Методом иммунодиффузии белок S-100 был обнаружен нами как во фракции, имеющей коэффициент седиментации меньше 80S, так и во фракции с большим коэффициентом седиментации, а также в осадке. Для устранения возможных загрязнений фракции РНП-частиц ее собирали и повторно центрифугировали. И в этом случае в их составе был обнаружен белок S-100. Для лучшей диссоциации частиц опыты по иммунодиффузии проводили с добавлением к ним 1%-ного ДДС-Na.

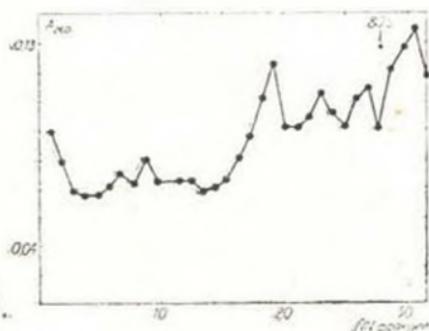


Рис. 3. Седиментационное распределение рибонуклеопротеидных частиц, выделенных из ядер мозга быка

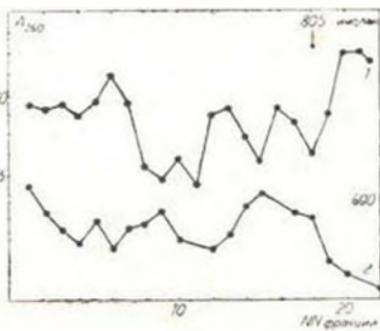


Рис. 4. Седиментационное распределение рибонуклеопротеидных частиц, выделенных из ядер мозга крысы: 1—поглощение при 260 нм, 2—радиоактивность

Таким образом, входя в состав РНП-частиц и оказывая влияние на фосфорилирование белков нуклеоплазмы и мембран, белок S-100 может принимать участие в процессинге гетерогенной ядерной РНК. Ранее нами было показано [25], что этот белок влияет на транспорт РНК из изолированных ядер мозга, то есть полученные данные подтверждают наше предположение о том, что белок S-100 может иметь значение в регуляции процесса передачи генетической информации на посттранскрипционном уровне. В то же время этот белок, видимо, может участвовать и в транскрипции, влияя на хроматин опосредованно.

## ON THE PARTICIPATION OF S-100 PROTEIN IN PHOSPHORYLATION OF BRAIN NUCLEOPLASM PROTEINS AND ITS PRESENCE IN RIBONUCLEOPROTEIN

KAPRALOV A. A., TYULENEV V. I., BELIK Ya. V.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Acad. Sci., Kiev

The effect of S-100 protein on phosphorylation of various sub-nuclear fractions proteins has been studied at the experiments in vitro. The protein mentioned has been established to increase the phosphory-

lation of protein fraction extracted from cell nuclei with the solution containing 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM tris (pH 8,0). This fraction contained RNP-particles. The most phosphorylated fractions were those with M<sub>r</sub> of about 80 and 150 kD. In the presence of S-100 protein phosphorylation of a number of other protein fractions were decreased. S-100 protein was detected in ribonucleoprotein particles by means of immunodiffusion assay. S-100 protein has been suggested to participate in the processes of transport and processing of heterogeneous nuclear RNA.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Полстаев А. Б., Миани Н., Мичетти Ф., Донато Р. Биохимия, т. 48, 1820—1824; 1983.
2. Miani N., Michetti F., De Renzi G., Caniglia A. *Experientia*, v. 29, p. 1499—1501, 1973.
3. Michetti F., Miani N., De Renzi G., Caniglia A., Correr S. *J. Neurochem.*, v. 22, p. 239—244, 1974.
4. Капралов А. А., Смирчинская Л. С., Белик Я. В., Тюленев В. И. *Нейрохимия*, т. 2, с. 26—33, 1983.
5. Тюленев В. И., Капралов А. А., Смирчинская Л. С., Белик Я. В. *Биохимия*, т. 48, с. 827—831, 1983.
6. Stewart J. *Biochem. et biophys. acta*, v. 263, № 1, p. 188—192, 1972.
7. Burdman J. A. *J. Neurochem.*, v. 19, p. 1459—1469, 1972.
8. Selwood S., Riches P. G., Harrap K. R., Rick-Wood D., Mac Gilltway A. J. *J. Biochem.*, v. 52, p. 551—566, 1975.
9. Aqutter P. S., Gleed Ch. D. *Biochem. J.*, v. 192, № 1, p. 185—189, 1980.
10. Капралов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И. *Нейрохимия*, т. 5, с. 219—220, 1986.
11. Folch J. Z., Lees N., Stanley C. N. *S. J. Biol. Chem.*, v. 26, p. 497—509, 1957.
12. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
13. Самарина О. П., Луканидин Е. М., Георгиев Г. П. *Молекуляр. биол.*, т. 2, № 1, с. 79—87, 1968.
14. Овчинников А. П., Вороница А. С., Степанов А. С.—В кн.: *Методы современной биохимии*, с. 42—44, М., Наука, 1975.
15. Гусев А. А., Цостков В. С. *Лаб. дело*, № 2, с. 43—45, 1961.
16. Smith Ch. D., Wells W. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 9360—9367, 1983.
17. Reddy A. V., De Langet P. J. *Int. J. Biochem.*, v. 17, № 6, p. 477—482, 1982.
18. Blanchard J. M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* v. 97, p. 524—529, 1980.
19. Wilks A. F., Knowler J. F. *Biochim. et biophys. acta*, v. 652, № 1, p. 228—233, 1981.
20. Kitzis A., Tichonicky L., Defer N., Kruh J. *Eur. J. Biochem.*, v. 111, № 1, p. 237—244, 1980.
21. Matrigne H., Jacob M. *Biochimie*, v. 54, p. 1169—1179, 1972.
22. Gallinaro-Matrigne H., Jacob M. *FEBS Lett.*, v. 36, № 1, p. 105—109, 1974.
23. Periasamy M., Brunel C., Jeanteur Ph. *Biochimie*, v. 61, p. 823—826, 1979.
24. Gallinaro-Matrigne H., Stevenin J., Jacob M. *Differentiation*, v. 9, № 3, p. 147—155, 1977.
25. Капралов А. А., Тюленев В. И. *Докл. АН УССР, сер. Б*, № 4, с. 62—64, 1985.

Получила 12. V 1988.